

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

29.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

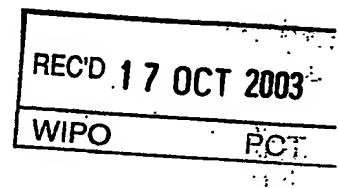
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 3月31日

出願番号
Application Number: 特願 2003-096372

[ST. 10/C]: [JP 2003-096372]

出願人
Applicant(s): セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社
第一製薬株式会社

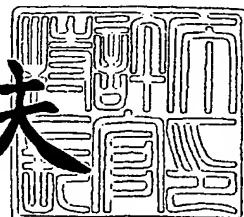


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 NP03-1022
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61P 3/10
C12N 09/50
C12Q 01/37
【発明の名称】 インシュリンプロモーターファクター1の分解方法、分解阻害方法および分解阻害剤
【請求項の数】 54
【発明者】
【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内
【氏名】 工藤 玄
【特許出願人】
【識別番号】 500520628
【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社
【特許出願人】
【識別番号】 000002831
【氏名又は名称】 第一製薬株式会社
【代理人】
【識別番号】 100088904
【弁理士】
【氏名又は名称】 庄司 隆
【電話番号】 03-3864-6572
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 067070
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 インシュリンプロモーターファクター1の分解方法、分解阻害方法および分解阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カルシウムの存在下、カルパインとインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) を共存させることを特徴とするIPF-1の分解方法。

【請求項2】 カルシウム濃度によりインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解程度を変えることを特徴とする、HNF-1 α の分解方法。

【請求項3】 カルシウムの存在下、m-カルパインおよび/または μ -カルパインとインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) を共存させることを特徴とするIPF-1の分解方法。

【請求項4】 カルパイン活性を阻害することを特徴とするインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1) の分解阻害方法。

【請求項5】 カルパインによるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の切断を阻害することを特徴とするIPF-1の分解阻害方法。

【請求項6】 少なくともカルパインとインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) を含む生体外試料をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、IPF-1の分解阻害方法。

【請求項7】 少なくともカルパインとインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) を発現している細胞をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、IPF-1の分解阻害方法。

【請求項8】 細胞が臍臓 β 細胞である請求項7に記載のIPF-1の分解阻害

方法。

【請求項9】 細胞が哺乳動物中に担持されている細胞である請求項7に記載のIPF-1の分解阻害方法。

【請求項10】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、IPF-1を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる1つ以上の物質である請求項6または7に記載のIPF-1の分解阻害方法。

【請求項11】 カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F、Mu-Val-HPh-CH₂F、4-フルオロフェニルスルホニル(Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH₂ClまたはZ-Val-Phe-CHOである請求項10に記載のIPF-1の分解阻害方法。

【請求項12】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインによるIPF-1の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項6または7に記載のIPF-1の分解阻害方法。

【請求項13】 カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによるIPF-1の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項6または7に記載のIPF-1の分解阻害方法。

【請求項14】 カルパインによるIPF-1の切断認識部位が、Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-MetおよびVal-Argからなる群より選ばれるものである請求項13に記載のIPF-1の分解阻害方法。

【請求項15】 カルパインがm-カルパインおよび/またはμ-カルパインである請求項4から14のいずれか1項に記載のIPF-1の分解阻害方法。

【請求項16】 カルパインを有効成分として含んでなるカルパインとインシルインプロモーターファクター1(insulin promoter factor 1)分解剤。

【請求項17】 カルパインがm-カルパインおよび/またはμ-カルパインで

ある請求項16に記載のIPF-1分解剤。

【請求項18】 カルパイン活性を阻害することを特徴とするインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1) 分解阻害剤。

【請求項19】 カルパインによるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の切断を阻害することを特徴とするIPF-1分解阻害剤。

【請求項20】 カルパイン活性を阻害する物質を有効成分として含んでなるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) 分解阻害剤。

【請求項21】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、IPF-1を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる1つ以上の物質である請求項20に記載のIPF-1分解阻害剤。

【請求項22】 カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F、Mu-Val-HPh-CH₂F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl) -Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH₂C1またはZ-Val-Phe-CHOである請求項21に記載のIPF-1分解阻害剤。

【請求項23】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインによるIPF-1の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項20に記載のIPF-1分解阻害剤。

【請求項24】 カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによるIPF-1の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項20に記載のIPF-1分解阻害剤。

【請求項25】 カルパインによるIPF-1の切断認識部位が、Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-MetおよびVal-Argからなる群より選ばれるものである請求項24に記載のIPF-1

1分解阻害剤。

【請求項26】 カルパインがm-カルパインおよび/またはμ-カルパインである請求項18から25のいずれか1項に記載のIPF-1の分解阻害剤。

【請求項27】 カルパインによるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解を阻害することを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生促進方法。

【請求項28】 カルシウム濃度によりインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解程度を変えることを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生調節方法。

【請求項29】 m-カルパインおよび/またはμ-カルパインによるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解を阻害することを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生調節方法。

【請求項30】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生促進方法。

【請求項31】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、グルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の產生促進方法。

【請求項32】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、IPF-1の分解に起因する疾患の防止方法および/または治療方法。

【請求項33】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および/または治療方法。

【請求項34】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、グルコーストランスポーター2の減少に起因する疾患の防止方

法および／または治療方法。

【請求項35】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法。

【請求項36】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生促進方法。

【請求項37】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、グルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の產生促進方法。

【請求項38】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、IPF-1の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項39】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項40】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、グルコーストランスポーター2の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項41】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法。

【請求項42】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生促進剤。

【請求項43】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる、グルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の產生促進剤。

【請求項44】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項45】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる、IPF-1の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項46】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでな

る、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項47】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる、グルコーストランスポーター2の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項48】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる、糖尿病の防止剤および／または治療剤。

【請求項49】 カルパインによるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによるIPF-1の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／またはIPF-1と被検化合物を接触させ、カルパインによるIPF-1の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによるIPF-1の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

【請求項50】 カルパインによるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによるIPF-1の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／またはIPF-1と被検化合物を接触させ、IPF-1量またはIPF-1分解物量を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによるIPF-1の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

【請求項51】 カルパインが、m-カルパインまたはμ-カルパインである請求項49または50に記載の同定方法。

【請求項52】 請求項49から51のいずれか1項に記載の同定方法で同定された化合物。

【請求項53】 カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくと

もいすれか1つと、インシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1)、IPF-1をコードするポリヌクレオチドおよびIPF-1をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいすれか1つを含んでなる試薬キット。

【請求項54】 カルパインが、m-カルパインまたは μ -カルパインである請求項53に記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、インシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1) (以下、IPF-1と略称する。) の分解および該分解の阻害に関する。より具体的にはカルパイン (calpain)、好ましくはm-カルパインまたは μ -カルパインによるIPF-1の分解方法および分解剤に関する。また、カルパイン、好ましくはm-カルパインまたは μ -カルパインによるIPF-1の分解阻害方法および分解阻害剤に関する。さらに、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばグルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法および産生促進剤に関する。また、IPF-1の分解に起因する疾患、例えば糖尿病の防止方法および/または治療方法並びに防止剤および/または治療剤に関する。さらに、カルパインによるIPF-1の分解を阻害する化合物の同定方法および該同定方法により同定された化合物に関する。また、カルパイン、IPF-1、これらをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターを含んでなる試薬キットに関する。

【0002】

【従来の技術】

IPF-1はパンクレアス・デュオディナムホメオボックス1 (Pancreas/duodenum homeobox 1; PDX-1) などとも呼ばれる転写因子であり、膵臓の β 細胞および δ 細胞で発現している。IPF-1は、種々の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーに結合し、当該遺伝子の転写を

活性化する。例えば、臍臓の β 細胞においてヘパトサイトヌクレアーファクター-1 α (HNF-1 α) や HNF-4 α などと転写因子ネットワークを形成し (非特許文献 1) 、 HNF-4 α の転写を制御している。HNF-4 α のプロモーター領域 P2 には IPF-1 結合部位が存在し、その変異が糖尿病の発症と相関することが報告されている (非特許文献 2)。また、IPF-1 がグルコーストランスポーター 2 (GLUT2) (非特許文献 3) 、インシュリン (非特許文献 4 および非特許文献 5) 、およびグルコキナーゼ (Glucokinase) (非特許文献 6) などの糖代謝関連遺伝子の発現を制御していることを示唆するデータが開示されている。GLUT2 遺伝子には IPF-1 が直接作用してその発現に関与する (非特許文献 3)。一方、IPF-1 遺伝子は、遺伝性 2 型糖尿病 MODY4 (Maturity-onset diabetes of the young 4) の原因遺伝子であることが明らかにされている (非特許文献 7)。

【0003】

カルパイン (EC 3.4.22.17) は、カルシウム依存性システインプロテアーゼであり、蛋白質を限定的に切断してその構造や機能を変化させる酵素である。カルパインには、構造的特徴、組織局在およびカルシウム要求性などによって分類される多くのアイソザイムが知られており、これらからなるスーパー ファミリーを構成している。

【0004】

m-カルパインは、カルパインスーパー ファミリーの 1 つであり、カルパイン 2 とも呼ばれ、多くの組織で発現している (非特許文献 8)。m-カルパインは 1 mM 程度のカルシウム濃度で活性化され、酵素活性を発現する。

【0005】

μ -カルパインは、カルパイン 1 とも呼ばれ、m-カルパインと同様に多くの組織で発現している (非特許文献 8 および非特許文献 9)。 μ -カルパインは、m-カルパインと比較してカルシウム要求性が低く、数十 μ M 程度のカルシウム濃度で活性化され、その酵素活性を発現する。

【0006】

m-カルパインおよび μ -カルパインにより分解される蛋白質としては、p 5 3、レチノイドXレセプター (R X R) など多くの転写因子が報告されている (非特許文献10、非特許文献11および非特許文献12)。カルパインにより分解される蛋白質には、カルパインによって優先的に切断されるアミノ酸モチーフが存在する (非特許文献13)。例えば、ロイシン残基 (Leu) またはバリン残基 (Val) などの疎水性アミノ酸残基に続く、チロシン残基 (Tyr)、メチオニン残基 (Met) またはアルギニン残基 (Arg) とそれに続くアミノ酸残基との間で切断される。現在、いくつかのカルパイン阻害剤が市販されているが、このような切断モチーフを含むアミノ酸配列からなるペプチドN-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHOがm-カルパインの競合阻害剤として知られている (非特許文献15) (CALBIOCHEM社)。またN-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHOは、 μ -カルパインの競合阻害剤として知られている (非特許文献16) (CALBIOCHEM社)。その他、不可逆的なカルパイン阻害剤であるZ-Leu-Leu-Tyr-CH₂F (非特許文献17) やMu-Val-HPh-CH₂F (非特許文献18)、可逆的なカルパイン阻害剤である4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO (非特許文献19)、およびLeu-Leu-Pro-クロロメチルケトン (Chloromethyl ketone) (非特許文献20) などが市販されている (CALBIOCHEM社)。

【0007】

カルパインは細胞機能の調節に関与しているため、カルパインの活性制御の不全やその遺伝子の欠損などにより種々の疾患が引き起こされる。例えば、いくつかの糖尿病モデル動物では組織のカルパイン活性が亢進している (非特許文献20および非特許文献21)。カルパイン阻害剤により臍島におけるグルコースに対するインシュリン分泌応答が増強されたことから、インシュリンの分泌と作用の調節へのカルパインの関与が示唆されている (非特許文献22)。また、カルパイン10遺伝子の変異と2型糖尿病罹患率との間の関連性が指摘されている (非特許文献23および非特許文献24)。

【0008】

一方、 m -カルパインおよび μ -カルパインは、外傷性脳損傷、アルツハイマー病、脳卒中および白内障に関与していることが示唆されている（非特許文献9）。

【0009】

以下に、本明細書で引用した文献を列記する。

【非特許文献1】 Shih, D. Q. et al., 「Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America」2001年, 第98巻, p. 14189-14191。

【非特許文献2】 Thomas, H. et al., 「Human Molecular Genetics」2001年, 第10巻, 第19号p. 2089-2097。

【非特許文献3】 「Molecular Endocrinology」1996年, 第10巻, p. 1327-1334。

【非特許文献4】 「EMBO Journal」1993年, 第12巻, p. 4251-4259。

【非特許文献5】 「Biochemical Journal」1995年, 第310巻, p. 997-1003。

【非特許文献6】 Bjorklund, A. et al., 「Diabetes」2000年, 第49巻, p. 1840-1848。

【非特許文献7】 Stoffers, D. A. et al., 「Nature genetics」1997年, 第17巻, p. 138-141。

【非特許文献8】 反町洋之、「生化学」2000年、第72巻、第11号、p. 1297-1315。

【非特許文献9】 Huang, Y. et al., 「TRENDS in Molecular Medicine」2001年, 第7巻, p. 355-362。

【非特許文献10】 Matsusima-Nishiwaki, R. et al

., 「Biochemical and Biophysical Research Communications」1996年, 第225巻, p. 946-951。

【非特許文献11】Pariat, M., et al., 「Molecular and Cellular Biology」1997年, 第17巻, p. 2806-2815。

【非特許文献12】Watt, F. et al., 「Nucleic Acids Research」1993年, 第21巻, p. 5092-5100。

【非特許文献13】Sasaki, T. et al., 「Journal of Biological Chemistry」1984年, 第259巻, p. 12489-12494。

【非特許文献14】Ravid, T. et al., 「Journal of Biological Chemistry」2000年, 第275巻, p. 35840-。

【非特許文献15】Debiasi, R. L. et al., 「Journal of Virology」1999年, 第73巻, p. 659-。

【非特許文献16】Dutt, P. et al., 「FEBS Letter」1998年, 第436巻, p. 367-。

【非特許文献17】Esser, R. E. et al., 「Arthritis and Rheumatism」1994年, 第37巻, p. 236-。

【非特許文献18】Nath, R. et al., 「Biochemical and Biophysical Research Communications」2009年, 第274巻, p. 16-。

【非特許文献19】Sasaki, T. et al., 「Journal of Biochemistry」1986年, 第99巻, p. 173-。

【非特許文献20】Brooks, B. A. et al., 「American Journal of Physiology」1983年, 第244巻, 第3号, p. C175-181。

【非特許文献21】Kobayashi, S. et al., 「Endocri

n o l o g i a J a p o n i c a 」 1 9 8 9 年, 第 3 6 卷, 第 6 号, p. 8 3
3 - 8 4 4 。

【非特許文献22】 S r e e m a n , S. K. et a l . , 「 D i a b e t s 」 2 0 0 1 年, 第 5 0 卷, p. 2 0 1 3 - 2 0 2 0 。

【非特許文献23】 H o r i k a w a , Y. et a l . , 「 N a t u r e G e n e t i c s 」 2 0 0 0 年, 第 2 6 卷, p. 1 6 3 - 1 7 5 。

【非特許文献24】 B a i e r , L. J. et a l . , 「 J o u r n a l o f C l i n i c a l I n v e s t i g a t i o n 」 2 0 0 0 年, 第 1 0 6 卷, p. R 6 9 - 7 3 。

【非特許文献25】 U l m e r , K. M. 「 S c i e n c e 」 1 9 8 3 年, 第 2 1 9 卷, p. 6 6 6 - 6 7 1 。

【非特許文献26】 「 ペプチド合成 」 (日本国) 、 丸善株式会社、 1 9 7 5 年、

【非特許文献27】 「 Pept i d e S y n t h e s i s 」 (米国) 、 インターサイエンス、 1 9 9 6 年。

【非特許文献28】 S r e e m a n , S. K. et a l . , 「 D i a b e t s 」 2 0 0 1 年, 第 5 0 卷, p. 2 0 1 3 - 2 0 2 0 。

【非特許文献29】 M a r u y a m a , K. et a l . , 「 I n t e r n a t i o n a l J o u r n a l o f M o l e c u l a r M e d i c i n e 」 2 0 0 0 年, 第 5 卷, p. 2 6 9 - 2 7 3 。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、 I P F - 1 の分解に関与する蛋白質を見出し、 I P F - 1 の分解に起因する疾患の防止手段および／または治療手段を提供しようとするものである。

【0011】

【課題解決のための手段】

【0012】

上記の如く I P F - 1 が種々の遺伝子の転写因子として作用することから、 I P F - 1 の減少や機能欠損は、当該遺伝子の発現を低減させ、その結果当該遺伝

子の遺伝子産物の減少に起因する生体機能の異常を引き起こし、さらには、当該遺伝子産物の減少に起因する疾患の原因になると考えられる。例えばIPF-1の減少や機能欠損により、膵臓のβ細胞において上記転写因子ネットワークが破綻し、糖代謝の異常が引き起こされると考えられる。IPF-1の減少や機能欠損の原因の1つとしては、例えばIPF-1の分解が挙げられる。

【0013】

したがって、IPF-1の分解を阻害することにより、IPF-1の機能、例えば転写因子としての機能を促進することが可能である。さらに、IPF-1の分解を阻害することにより、IPF-1の減少や機能欠損に起因する疾患、あるいはIPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止および／または治療が可能になる。

【0014】

かかる現状において本発明は、IPF-1の分解に関与する蛋白質を見出し、IPF-1の分解に起因する疾患の防止手段および／または治療手段を提供することを目的とした。

【0015】

すなわち本発明は、

1. カルシウムの存在下、カルパインとインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) を共存させることを特徴とするIPF-1の分解方法、
2. カルシウム濃度によりインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解程度を変えることを特徴とする、HNF-1 α の分解方法、
3. カルシウムの存在下、m-カルパインおよび／または μ -カルパインとインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) を共存させることを特徴とするIPF-1の分解方法、
4. カルパイン活性を阻害することを特徴とするインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1) の分解阻害

方法、

5. カルパインによるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の切断を阻害することを特徴とするIPF-1の分解阻害方法、
6. 少なくともカルパインとインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) を含む生体外試料をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、IPF-1の分解阻害方法、
7. 少なくともカルパインとインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) を発現している細胞をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、IPF-1の分解阻害方法、
8. 細胞が臍臓β細胞である前記7. のIPF-1の分解阻害方法、
9. 細胞が哺乳動物中に担持されていることを特徴とする細胞である前記7. のIPF-1の分解阻害方法、
10. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、IPF-1を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる1つ以上の物質である前記6. または7. のIPF-1の分解阻害方法、
11. カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F、Mu-Val-HPh-CH₂F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH₂C1またはZ-Val-Phe-CHOである前記10. のIPF-1の分解阻害方法、
12. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインによるIPF-1の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記6. または7. のIPF-1の分解阻害方法、
13. カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによるI

P F - 1 の切断認識部位の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記 6. または 7. の I P F - 1 の分解阻害方法、

1 4. カルパインによる I P F - 1 の切断認識部位が、 L e u - T y r 、 L e u - M e t 、 L e u - A r g 、 V a l - T y r 、 V a l - M e t および V a l - A r g からなる群より選ばれるものである前記 13. の I P F - 1 の分解阻害方法、

1 5. カルパインが m - カルパインおよび／または μ - カルパインである前記 4. から 14. のいずれかの I P F - 1 の分解阻害方法、

1 6. カルパインを有効成分として含んでなるカルパインとインシュリンプロモーターファクター 1 (i n s u l i n p r o m o t e r f a c t o r 1) 分解剤、

1 7. カルパインが m - カルパインおよび／または μ - カルパインである前記 16. の I P F - 1 分解剤、

1 8. カルパイン活性を阻害することを特徴とするインシュリンプロモーターファクター 1 (i n s u l i n p r o m o t e r f a c t o r 1) 分解阻害剤、

1 9. カルパインによるインシュリンプロモーターファクター 1 (i n s u l i n p r o m o t e r f a c t o r 1 ; I P F - 1) の切断を阻害することを特徴とする I P F - 1 分解阻害剤、

2 0. カルパイン活性を阻害する物質を有効成分として含んでなるインシュリンプロモーターファクター 1 (i n s u l i n p r o m o t e r f a c t o r 1 ; I P F - 1) 分解阻害剤、

2 1. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、 I P F - 1 を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる 1 つ以上の物質である前記 20. の I P F - 1 分解阻害剤、

2 2. カルパインインヒビターが、 N - A c e t y l - L e u - L e u - M e t - C H O 、 N - A c e t y l - L e u - L e u - N l e - C H O 、 Z - L e u - L e u - T y r - C H ₂ F 、 M u - V a l - H P h - C H ₂ F 、 4 - フルオロフェニルスルホニル (F l u o r o p h e n y l s u l f o n y l) - V a l - L

eu-CHO、Leu-Leu-Phen-CH₂Cl または Z-Val-Phen-CHO である前記21. のIPF-1分解阻害剤、

23. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインによるIPF-1の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記20. のIPF-1分解阻害剤、

24. カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによるIPF-1の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記20. のIPF-1分解阻害剤、

25. カルパインによるIPF-1の切断認識部位が、Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-Met および Val-Arg からなる群より選ばれるものである前記24. のIPF-1分解阻害剤、

26. カルパインがm-カルパインおよび/または μ -カルパインである前記18. から25. のいずれかのIPF-1の分解阻害剤、

27. カルパインによるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解を阻害することを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生促進方法、

28. カルシウム濃度によりインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解程度を変えることを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生調節方法、

29. m-カルパインおよび/または μ -カルパインによるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解を阻害することを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生調節方法、

30. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生促進方法、

31. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、グ

ルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の產生促進方法、

32. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、IPF-1の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

33. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

34. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、グルコーストランスポーター2の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

35. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法、

36. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生促進方法、

37. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、グルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の產生促進方法、

38. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、IPF-1の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

39. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

40. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、グルコーストランスポーター2の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

41. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法、

42. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生促進剤、

43. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、グルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の產生促進剤、

44. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる医薬組成物、

45. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、IPF-1の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

46. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

47. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、グルコーストランスポーター2の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

48. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、糖尿病の防止剤および／または治療剤、

49. カルパインによるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによるIPF-1の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／またはIPF-1と被検化合物を接触させ、カルパインによるIPF-1の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによるIPF-1の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法、

50. カルパインによるインシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによるIPF-1の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／またはIPF-1と被検化合物を接触させ、IPF-1量またはIPF-1分解物量を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによるIPF-1の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法、

51. カルパインが、m-カルパインまたは μ -カルパインである前記49. または50. の同定方法、

52. 前記49. から51. のいずれかの同定方法で同定された化合物、

53. カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、インシュリンプロモーターファクター1 (insulin promoter factor 1; IPF-1)、IPF-1をコードするポリヌクレオチドおよびIPF-1をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キット、

54. カルパインが、m-カルパインまたは μ -カルパインである前記53. の試薬キット、
からなる。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明においては、m-カルパインまたは μ -カルパインがIPF-1を分解することを見出した。m-カルパインまたは μ -カルパインによるIPF-1（配列番号1）の切断認識部位は、下記の3箇所であると考えられる（図1）：アミノ酸配列第13番目のロイシン（L）に続くチロシン（Y）とそれに続くリジン（K）との間；第36番目のロイシン（L）に続くチロシン（Y）とそれに続くメチオニン（M）との間；および第181番目のバリン（V）に続くメチオニン（M）とそれに続くロイシン（L）との間。

【0017】

本明細書においてはアミノ酸を1文字表記または3文字表記することがある。また、ペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドを意味し、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称する短鎖ペプチド、並びにポリヌクレオチドや蛋白質などの長鎖ペプチドを包含する。

【0018】

上記知見に基づいて達成した本発明において、カルパインはカルパインスーパーファミリーに属するプロテアーゼを全て包含するものである。カルパインスーパーファミリーに属するプロテアーゼとしては、m-カルパイン、 μ -カルパイン、カルパイン3、カルパイン5、カルパイン8、カルパイン9、カルパイン1

0、カルパイン11、カルパイン12およびカルパイン13などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくはm-カルパインまたは μ -カルパインである。 μ -カルパインはm-カルパインと比較してカルシウム要求性が低く、より低濃度のカルシウムにより活性化される。そのため、 μ -カルパインはm-カルパインと比較してカルシウム濃度上昇により活性化され易く、生体内で主に作用している可能性が考えられることから、より好ましくは μ -カルパインである。これら各プロテアーゼを使用するときは、これらを単独で用いてもよいし、2つ以上を組合せて用いることもできる。

またカルパインは、IPF-1のみを特異的に分解するものに限らず、複数の蛋白質、例えば複数の転写因子の分解に関与するものであってもよい。

【0019】

本発明においては、IPF-1の分解剤および分解方法を提供する。当該IPF-1の分解剤は、カルパインを有効成分として含んでなる。また、当該IPF-1の分解方法はカルパインとIPF-1を共存させることを特徴とする。カルパインはカルシウム依存性プロテアーゼであるため、該共存はカルシウム存在下で行なうことが好ましい。カルシウム濃度は、カルパインのカルシウム要求性を考慮し、カルパインを活性化してそれらの酵素活性を誘発できる濃度を用いる。例えば、m-カルパインを活性化するためには、好ましくは約1mM以上のカルシウム濃度が好適である。 μ -カルパインを活性化するためには、好ましくは約10 μ M以上、より好ましくは約20 μ M以上、さらに好ましくは約30 μ M以上のカルシウム濃度が好適である。また、カルパインによるIPF-1の分解にはカルシウム濃度依存性があるため、カルシウム濃度を調節することによりカルパインによるIPF-1の分解程度を所望の程度に調節することができる。かかるカルシウム濃度の調節を特徴とするIPF-1の分解方法も本発明の範囲に包含される。また、カルパインとIPF-1を少なくとも含んでなり、カルパインとIPF-1を共存させることを特徴とするIPF-1の分解系を構築することが可能である。

【0020】

本発明に係るIPF-1の分解方法および分解系は、インビトロのものであつ

てよく、インビボのものであってもよい。例えば、カルパインとIPF-1を、例えば試験管内やマルチウエルプレート内で、カルシウムの存在下で共存させて、IPF-1を分解させる分解方法および分解系が例示できる。あるいは、カルパインとIPF-1を共発現させた細胞を用いた分解方法および分解系を例示できる。発現に用いる細胞は、蛋白質の発現のために一般的に使用されている細胞を使用可能である。これら蛋白質の発現は、公知の遺伝子工学的手法を用いて実現することができる。かかる細胞を用いた分解方法および分解系において、細胞内カルシウム濃度を調節する、例えばカルパインが活性化する濃度に調節するためには、イオノフォアの使用が好適である。イオノフォアは、A23187など公知のものを用いることができる。また、非ヒト動物にカルパイン、さらにIPF-1の各遺伝子を自体公知の遺伝子工学的手法を用いて導入することにより、非ヒト動物におけるIPF-1の分解方法および分解系を提供することが可能である。

【0021】

本発明において使用するカルパインおよびIPF-1は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、これら蛋白質は、それらのN末端側やC末端側に別の蛋白質やペプチドなどを、直接的にまたはリンカーペプチドなどを介して間接的に、遺伝子工学的手法などを用いて付加することにより標識化したものであってもよい。好ましくは、カルパインとIPF-1の相互作用およびこれら蛋白質の機能、例えばカルパインとIPF-1の接触、カルパインの酵素活性およびIPF-1の転写因子機能などが阻害されないような標識化が望ましい。付加する蛋白質やペプチドなどとしては、例えばグルタチオン S-トランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、免疫グロブリンのFc断片、Histag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはXpress-tag、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ビオチン、グリーン蛍光蛋白質、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate)、フィコエリスリン (phycoerythrin)

erythrin)、あるいは放射性同位元素などが挙げられるが、これらに限定されない。標識化するとき、これら蛋白質やペプチドなどは単独で付加してもよいし複数を組合させて付加することもできる。これら標識化に用いた蛋白質またはペプチドなどの物質自体、またはその機能を測定することにより、IPF-1の分解を検出することが可能である。また、遺伝子導入に用いるカルパインおよびIPF-1の各遺伝子は、ヒトcDNAライブラリーから自体公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。これら遺伝子を適当な発現ベクターDNA、例えば細菌プラスミド由来のベクターなどに自体公知の遺伝子工学的手法で導入し、上記各遺伝子を含有するベクターを得て、遺伝子導入に利用することができる。遺伝子導入は、自体公知の遺伝子工学的手法を用いて実施可能である。

【0022】

上記IPF-1の分解剤、分解方法および分解系は、IPF-1の機能解明やIPF-1が関与する転写因子ネットワークについての研究、およびIPF-1の分解に起因する疾患、例えば糖尿病におけるIPF-1やカルパインの関与についての分子レベルでの研究などに有用である。また、当該分解方法および分解系を用いて、IPF-1の分解を阻害する化合物の同定方法を構築することも可能である。

【0023】

本発明はまた、IPF-1分解の阻害剤および阻害方法を提供する。該阻害剤および阻害方法は、カルパイン活性を阻害すること、またはカルパインによるIPF-1の切断を阻害することを特徴とする。カルパイン活性の阻害またはカルパインによるIPF-1切断の阻害は例えば、カルパインの酵素活性を阻害することにより、またはカルパインとIPF-1の接触を阻害することにより実施できる。

【0024】

IPF-1分解の阻害剤および阻害方法はまた、カルパイン活性を阻害する物質を用いて達成することができる。本発明の範囲には、カルパイン活性を阻害する物質を有効成分として含んでなるIPF-1分解の阻害剤、およびカルパイン

活性を阻害する物質を用いることを特徴とする I P F - 1 分解の阻害方法が含まれる。カルパイン活性を阻害する物質により処理される対象物としては、少なくともカルパインと I P F - 1 を含む対象物、例えば少なくともこれらを含む生体外試料が挙げられる。また、少なくともカルパインと I P F - 1 を発現している細胞、例えば臍臓 β 細胞など、およびかかる細胞を担持している哺乳動物なども当該対象物に含まれる。

【0025】

カルパイン活性を阻害する効果を有する物質の例としては、拮抗阻害効果を有するペプチド類、抗体および低分子化合物などが挙げられる。具体的には、カルパインインヒビターとして知られている N - A c e t y l - L e u - L e u - M e t - C H O 、 N - A c e t y l - L e u - L e u - N l e - C H O 、 Z - L e u - L e u - T y r - C H ₂ F 、 M u - V a l - H P h - C H ₂ F 、 4 - フルオロフェニルスルホニル (F lu o r o p h e n y l s u l f o n y l) - V a l - L e u - C H O 、 L e u - L e u - P h e - C H ₂ C I または Z - V a l - P h e - C H O などが例示できる。抗体としては、カルパインまたは I P F - 1 を認識する抗体であって、カルパインによる I P F - 1 の分解を阻害する抗体が挙げられる。I P F - 1 を認識する抗体は、さらに好ましくは I P F - 1 の機能、例えば転写因子活性を阻害しないものが好適である。かかる抗体は、カルパインまたは I P F - 1 自体、またはこれらが相互作用する部位のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により得ることができる。低分子化合物としては、カルパインの酵素活性を阻害する化合物、好ましくは該酵素活性を特異的に阻害する化合物が挙げられる。かかる化合物は、例えば、本発明に係る分解方法または分解系を利用して、カルパインによる I P F - 1 の分解を阻害するものを同定することにより得ることができる。カルパインを特異的に阻害するとは、カルパインを強く阻害するが、他の酵素は阻害しないか、弱く阻害することを意味する。

【0026】

また、カルパインによる I P F - 1 分解の阻害は、例えば両蛋白質が相互作用する部位のアミノ酸配列からなるペプチドを用いて実施可能である。かかるペプ

チドとして、IPF-1のアミノ酸配列（配列番号1）においてカルパインにより切断される部位、すなわち切断認識部位のアミノ酸配列を含むペプチドが例示できる。例えば、m-カルパインまたは μ -カルパインの切断認識部位のアミノ酸配列は、LY、LM、LR、VY、VMまたはVRであると考えられる。このような切断認識部位のアミノ酸配列を少なくとも1つ含むペプチドが好ましい。かかるペプチドは、カルパインによるIPF-1分解を競合的に阻害すると考えられる。より好ましくは、IPF-1のアミノ酸配列（配列番号1）のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり、且つカルパインの切断認識部位のアミノ酸配列を含むペプチドが挙げられる。これらペプチドはさらに、酵素とペプチドの結合を安定化し、ペプチドが酵素から解離し難くするために通常よく使用される修飾、例えばC末端のアルデヒド化またはN末端のアセチル化などの修飾を施したものであってもよい。

【0027】

上記ペプチドは、カルパインまたはIPF-1のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法により合成したものから、カルパインによるIPF-1の分解を阻害するものを選択することにより得ることができる。

【0028】

このように特定されたペプチドに、1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入などの変異を導入したものも本発明の範囲に包含される。このような変異を導入したペプチドは、さらにカルパインによるIPF-1の切断を阻害するものが好ましい。変異を有するペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加または挿入などの変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマー（Ulmer）の技術（非特許文献25）を利用できる。このような変異の導入において、当該ペプチドの基本的な性質（物性、機能または免疫学的活性など）を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸など）の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基などを、例えばアミド化修飾す

るなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

【0029】

上記ペプチドは、ペプチド化学において知られる一般的な方法で製造できる。例えば、公知文献に記載の方法（非特許文献26および非特許文献27）が例示できるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。

【0030】

本発明においてはまた、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の产生調節方法を提供可能である。产生調節方法の1つとしては、カルパインによるIPF-1の分解を阻害することを特徴とする該遺伝子産物の产生促進方法が挙げられる。具体的には、該产生促進方法は、上記IPF-1分解阻害剤またはIPF-1分解阻害方法を使用することにより達成できる。また、上記IPF-1分解阻害剤を含んでなる、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の产生促進剤も本発明の範囲に包含される。产生調節方法の別の1つとしては、カルシウム濃度を調節してIPF-1の分解程度を所望の程度に調節することにより、当該遺伝子産物の产生を調節する方法が挙げられる。カルシウム濃度を高濃度にしてカルパインを活性化させることによりIPF-1を分解することができるため、当該遺伝子産物の产生を低下させることができる。カルシウム濃度を低濃度にしてカルパインの酵素活性を減弱させることにより、IPF-1の分解を阻害することができるため、当該遺伝子産物の产生を促進することができる。IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物としては、IPF-1の結合部位をプロモーターまたはエンハンサー内に有する遺伝子の遺伝子産物が挙げられる。具体的には、GLUT2遺伝子などの遺伝子産物が例示できる。

【0031】

さらに本発明においては、IPF-1の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、並びに当該疾患の防止方法および／または治療方法を提供する。本発明に係るIPF-1の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤は、上記IPF-1分解阻害剤を含んでなる。本発明に係るIPF-1の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法は、上記IPF-1分解阻害剤ま

たは I P F - 1 分解阻害方法を使用することにより達成できる。I P F - 1 の分解に起因する疾患としては、例えば I P F - 1 が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患が挙げられる。例えば、G l u t 2 の減少に起因する疾患が例示できる。また、I P F - 1 は転写因子として H N F - 4 α 遺伝子に作用してその発現を調節するため（非特許文献 2）、I P F - 1 の分解により H N F - 4 α が減少し、その結果 H N F - 4 α により発現が調節されているインシュリンが減少すると考えられる。したがって、I P F - 1 分解阻害剤または I P F - 1 分解阻害方法により、インシュリンの産生促進が可能になり、さらに、インシュリンの減少に起因する疾患の防止および／または治療が可能になる。実際、マウスの膵臓ランゲルハンス島にカルパイン阻害剤を暴露させるとグルコース刺激によるインシュリン分泌が増加することが報告されている（非特許文献 28）。しかし、この報告においては、カルパインと I P F - 1 の関連については開示されていない。また、膵島においては、高血糖状態が持続すると細胞内カルシウム濃度が上昇し、グルコース刺激性インシュリン分泌の脱感作が起こる（非特許文献 6）。本発明における知見から、長期の高血糖による細胞内カルシウム濃度の上昇によりカルパインが活性化され、その結果 I P F - 1 が分解されるために、膵臓 β 細胞での転写因子ネットワークが破綻して糖代謝の異常が起き、ひいては 2 型糖尿病と同様の病態が誘発されるというカスケードが存在すると考えられる。したがって本発明によれば、上記カスケードにおいてカルパインによる I P F - 1 の分解を阻害できるため、糖代謝の正常化を図り、糖代謝関連因子の減少に起因する疾患、例えば糖尿病を防止および／または治療可能である。

【0032】

本発明においてはまた、カルパインによる I P F - 1 の分解を阻害する化合物の同定方法を提供する。該同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。また、本発明に係る分解系または分解方法を利用して、該同定方法を実施可能である。被検化合物としては、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、またはカルパインおよび I P F - 1 の一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物などが挙げられる。あるいは、I P F - 1 のカルパインによる切断認識部位のペプチドの構造に基づいて

ドラッグデザインして得られた化合物なども被検化合物として好適である。

【0033】

具体的には、カルパインによるIPF-1の切断を可能にする条件を選択し、当該条件下でカルパインおよび／またはIPF-1と被検化合物を接触させ、IPF-1の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、カルパインによるIPF-1の分解を阻害する化合物を同定できる。カルパインによるIPF-1の切断を可能にする条件としては、例えばカルパインを活性化する濃度のカルシウムの存在下であることが挙げられる。また、該条件はインビトロのものであってよく、インビボのものであってもよい。例えば、カルパインとIPF-1を共発現させた細胞を用いることもできる。カルパインおよび／またはIPF-1と被検化合物の接触は、カルパインによるIPF-1の分解反応の前に行なってもよいし、当該反応に共存させることにより行なってもよい。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るもの指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るもの指す。シグナルとしてはルシフェラーゼ、グリーン蛍光蛋白質、および放射性同位体など、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子など、または検出用のエピトープタグ、例えば6×Histagなど、公知のものが利用できる。これらシグナルまたはマーカーは、単独で使用してもよく、2つ以上を組合せて用いてもよい。これらシグナルまたはマーカーの検出方法は当業者には周知のものである。簡便には、IPF-1の分解は、IPF-1量またはIPF-1分解物量の存在若しくは不存在および／または変化の測定により検出できる。IPF-1量またはIPF-1分解物量の定量は、自己公知の蛋白質またはペプチドの検出方法、例えばウェスタンプロッティング法などを用いて実施できる。あるいは、IPF-1の分解の検出は、IPF-1の転写因子活性の存在若しくは不存在および／または変化の測定により行なうことができる。具体的には、例えば、IPF-1とカルパインを発現している細胞に、Glut2遺伝子のプロモーター領域をその上流に組み込んだレポーター遺伝

子を含むプラスミドをトランスフェクトし、被検化合物とこの細胞を接触させた場合のレポーター遺伝子の発現量を、当該被検化合物と接触させなかつた場合のレポーター遺伝子の発現量と比較することにより行なうことができる。

【0034】

上記同定方法で得られた化合物は、上記ペプチドと同様にIPF-1の分解阻害剤として利用可能である。上記ペプチドおよび／または上記化合物を含む阻害剤は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより、医薬組成物として調製可能である。医薬組成物の調製において、これらペプチドおよび／または化合物は、単独で使用することもできるし、複数を組み合わせて使用することも可能である。

【0035】

本発明に係るIPF-1分解阻害剤、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばGLUT2遺伝子の遺伝子産物の產生促進剤、並びにIPF-1の分解に起因する疾患、例えばIPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、具体的にはGLUT2などの減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病などの防止剤および／または治療剤の処方は、適当な医薬担体と組合わせて処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量の上記ペプチド、抗体、化合物、IPF-1分解阻害剤、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばGLUT2遺伝子の遺伝子産物の產生促進剤、並びにIPF-1の分解に起因する疾患、例えばIPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、具体的にはGLUT2などの減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病などの防止剤および／または治療剤に、さらに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方は投与経路に適したものを選択すればよく、該処方は当業者によく知られている。また、処方するときには、これらを単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。

【0036】

投与形態は、全身投与であっても局所投与であってもよい。全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜投与若しくは経皮投与を用いることもできる。局所的な投与においては、膏薬、パスター、ゲルなどの形態での投与であってもよい。

【0037】

必要な用量範囲は、上記ペプチド、抗体、化合物、IPF-1分解阻害剤、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばGLUT2遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤、並びにIPF-1の分解に起因する疾患、例えばIPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、具体的にはGLUT2などの減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病などの防止剤および/または治療剤の有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり0.1μg乃至100μgの範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

【0038】

製剤化にあたっては、例えばペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチド、抗体、化合物など各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には、例えば散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリンなどの包接体などの製剤化方法が利用できる。

【0039】

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュークロース、マンニトールなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性

剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体が用いられる。

【0040】

懸濁剤は、水、シュークロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、PEGなどのグリコール類、油類を使用して製造できる。

【0041】

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

【0042】

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルムなど）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより行い得る。

【0043】

脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油などの植物油、MCTなど）、乳化剤（リン脂質など）などを混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型など）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖など）が例示される。

【0044】

シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水などに加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。このとき、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ α 、 β 、 γ 型）を適宜選択すればよい。

【0045】

本発明に係わるペプチドおよび上記同定方法で得られた化合物は、試薬として

利用できる。例えばIPF-1が関与する転写因子ネットワークについての研究およびIPF-1の機能不全や分解に起因する疾患、例えば糖尿病におけるIPF-1やカルパインの関与についての分子レベルでの研究などに有用である。

【0046】

さらに本発明は、カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、IPF-1、IPF-1をコードするポリヌクレオチドおよびIPF-1をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットを提供する。当該試薬キットは、例えば本発明に係る同定方法に使用できる。

【0047】

上記試薬キットは、カルパインとIPF-1の分解を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、バッファー、並びに塩など、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤などの物質を含んでいてもよい。製剤化にあたっては、使用する各物質それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0048】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【0049】

【実施例1】

(カルパインによるヒトIPF-1の分解)

m-カルパインおよびμ-カルパインによるIPF-1の分解を、インビトロ蛋白質分解試験で検討した。

【0050】

<材料>

μ-カルパインはヒト由来のもの (Calpain 1, human erythrocytes, Calbiochem社) を使用した。m-カルパインは

ウサギ由来のもの (PROTEASE, Calcium Activated Neutral calpain, Sigma社) およびラット由来のもの (Calpain 2, rat recombinant, E. coli, Calbiochem社) を使用した。

【0051】

ヒトIPF-1は、IPF-1発現プラスミドを下記のように構築し、該プラスミドを用いて蛋白質の合成を行なうことにより得た。まず、ヒトIPF-1 cDNAを、ヒト肝polyA⁺ RNAから逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により獲得し、シーケンスにより塩基配列を確認した。その後、N末端にヒスチジンタグ (His-tag) およびXpress-tagを付加させる動物細胞用発現プラスミドp cDNA3.1/His (Invitrogen社) にBamHIおよびEcoRIサイトで組込み、IPF-1発現プラスミドを構築した。クローニングしたIPF-1 cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIデータベースのアクセション番号NP_000200 (登録遺伝子名はIPF。) と同一であった。

【0052】

IPF-1発現プラスミドを用い、IPF-1蛋白質の合成を、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega社) を使用してインビトロで行なった。すなわち、IPF-1発現プラスミドとTNT T7 Quick Master Mixを混合し、メチオニン存在下で30℃にて1.5時間インキュベーションしてIPF-1を合成した。

【0053】

<方法>

インビトロにおける蛋白質分解試験は、IPF-1にμ-カルパインまたはm-カルパインを添加し、200mM Tris-HCl (pH 7.8) / 1mM デチオスレイトール (DTT) / 6mM CaCl₂存在下で37℃にて1時間インキュベーションすることにより行なった。各カルパインの反応系での最終濃度は、ヒトμ-カルパインは50unit/mL、ウサギm-カルパインは蛋

白質濃度として $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 、およびラットm-カルパインは $59\text{unit}/\text{mL}$ とした。対照実験として、IPF-1をカルパインを添加せずにカルシウム存在下で同様にインキュベーションした。また、カルシウム非存在下での蛋白質分解試験を行なうために、 6mM CaCl_2 の代わりに 10mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を添加した試料を作製して同様にインキュベーションした。インキュベーション後の試料は、等容量の $2\times$ ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)サンプルバッファー [$4\% \text{ SDS}/125\text{mM Tris-HCl}$, pH 6.8/ 20% グリセロール/ 0.01% プロムフェノールブルー(BPB)/ 10% β-メルカプトエタノール(mercaptoethanol)]を加えて5分間加熱し、 $5-20\%$ SDS-PAGEにより分離した。その後、抗Xpress抗体(Invitrogen社)および抗IPF-1(PDX-1)抗体/N-18(Santa Cruz社)を用いてウェスタンブロッティング法によりIPF-1を検出した。検出はECL western blotting detection kit(Amersham Pharmacia Biotech社)を使用して行なった。

【0054】

<結果>

図2Aおよび図2Bに示したように、ヒトμ-カルパイン、ウサギm-カルパインおよびラットm-カルパインによるIPF-1のインビトロでの分解が認められた。一方、カルシウム非存在下またはm-カルパイン無添加ではIPF-1は分解されなかった。以上の結果から、IPF-1はμカルパインおよびm-カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが明らかになった。

【0055】

【実施例2】

(ヒトm-カルパインによるIPF-1の分解)

ヒトm-カルパインによるヒトIPF-1の分解について検討するために、昆虫細胞で発現させたヒトm-カルパインを用いてインビトロ蛋白質分解試験を実施した。

【0056】

<材料>

ヒトIPF-1は、実施例1で作製したもの用いた。

ヒトm-カルパインは、昆虫細胞で発現させたものを用いた。まず、ヒトm-カルパイン cDNAを、ヒト肝 polyA⁺ RNA (Clontech社) からRT-PCRにより獲得した。シーケンスにより塩基配列を確認し、PCRエラーと思われる塩基置換はQuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE社) により修正した。また、ヒトカルパインスモールサブユニット1 cDNA (calpain small subunit 1 cDNA) をヒト骨格筋cDNA (Clontech社) からPCRにより獲得し、シーケンスにより配列を確認した。クローニングしたm-カルパイン cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIDータベースのアクセスション番号AAA35645 (登録遺伝子名はCAPN2。)と、73番目および74番目のアミノ酸がメチオニン-アルギニン (MR) からイソロイシン-グルタミン酸 (IE) に置換されている以外は同一であった。このIEへの置換はSwiss-Prot (P17655)においてコンフリクト (Conflict) の記載がある。また、カルパインスモールサブユニット1 cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIDータベースのアクセスション番号NP_001740 (登録遺伝子名はCAPNS1。)と同一であった。蛋白質発現はバキュロウイルスを用いた昆虫細胞 (夜盗蛾sf-9細胞) 発現系にて行なった。すなわち、各々のcDNAをpFastBac DUALプラスミド (Invitrogen社) に組込み、Bac-to-Bac Baculo virus Expression Systems (Invitrogen社) を用いて、sf-9細胞にm-カルパインおよびカルパインスモールサブユニット1を共発現させた。これら蛋白質を発現させたsf-9細胞は、冷却したリン酸緩衝生理食塩水 (以下、PBSと称する。) で洗浄後、凍結融解により破碎した。ついで、20mM Tris-HCl (pH 7.5) / 5mM EDTA / 10mM β-メルカプトエタノールを添加し、氷上で超音波処理した後に遠心処理 (15,000 rpm × 30分間) し、その上清を活性体試料 (細胞ライセートと称する。) とした。また、蛋白質非発現sf-9細胞のライセートを同

様に調製し、陰性対照として使用した。ライセートのm-カルパイン活性の有無は、基質としてカゼインを用いて確認した（非特許文献29）。また、陽性対照としてラットm-カルパインを用いた。

【0057】

＜方法＞

インビトロ蛋白質分解試験は、m-カルパインとして、m-カルパインおよびカルパインスモールサブユニット1を共発現させたsf-9細胞のライセートを用いた以外は、実施例1と同様の方法で行なった。これら蛋白質を発現させたsf-9細胞ライセートの反応系における最終濃度は、蛋白質濃度として2.33mg/mLとした。ラットm-カルパインの反応系での最終濃度は59unit/mLとした。IPF-1の検出は、抗IPF-1抗体/N-18（Santa Cruz社）のみを用いた以外は実施例1と同様の方法で行なった。

【0058】

＜結果＞

図3に示すように、ヒトm-カルパインによるヒトIPF-1の分解が認められた。一方、カルシウム非存在下、非発現sf-9細胞ライセート（図中、コントロールsf-9細胞ライセートと表示）およびカルパイン無添加（図中、対照と表示）ではいずれもIPF-1の分解が認められなかった。これらから、IPF-1はヒトm-カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが明らかになった。

【0059】

【実施例3】

（イオノフォア添加によるヒトIPF-1の分解）

細胞内におけるIPF-1のカルパインによる分解を検討するため、カルシウムイオノフォア添加によるIPF-1分解試験を実施した。

【0060】

＜方法＞

細胞数0.5×10⁶のHEK293T細胞を37℃にて5%CO₂存在下で24時間培養した後（直径60mmシャーレ）、2μgのIPF-1発現プラス

ミド（実施例1参照）をFuGENE 6 Transfection Reagent (Roche社)を用いてトランスフェクションした。2日間培養後、イオノフォア A23187 (4-bromo-calcium ionophore A23187, Sigma社) 10 μg/mLを添加した培地と交換し、4時間培養した。陰性対照群は0.2%DMSO含有培地と交換した。所定時間培養後、細胞を冷却したPBS（-）で洗浄し、350 μlの低張細胞溶解バッファー [10 mM HEPES, pH 7.5 / 10 mM MgCl₂ / 4.2 mM KC1 / 1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)] に懸濁した後、氷上で20分間放置した。細胞をホモジナイザーで破碎後、4℃にて600 gで10分間遠心処理し、その上清を細胞質画分、沈殿を核画分として回収した。核画分はさらに2×PBS / 1% ノニデット P-40 / 0.1% SDSからなる溶液に懸濁し、超音波処理にて破碎した。核画分および細胞画分は、等量の2×SDSサンプルバッファーを加えて5分間加熱後、5-20% SDS-PAGEにより分離した。IPF-1の検出は、実施例1と同様の方法で行なった。

【0061】

＜結果＞

図4に示したように、イオノフォア添加によりIPF-1の分解が認められた。このことから、IPF-1は、細胞内においてカルシウム濃度の上昇に伴い、カルシウムイオン依存性システインプロテアーゼであるカルパインによって分解されたと考えられる。

【0062】

【発明の効果】

本発明においては、m-カルパインおよびμ-カルパインがIPF-1を切断し分解することを初めて明らかにした。IPF-1は転写因子であり、種々の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーに結合し、当該遺伝子の転写を活性化する。IPF-1が、インシュリン、GLUT2およびグルコキナーゼなどの糖代謝関連因子の発現に関与していること、および遺伝性2型糖尿病の原因遺伝子であることが知られていることなどから、IPF-1の減少や機能欠損が糖尿病に

関与すると考えられる。したがって、本発明において提供する I P F - 1 分解阻害剤および／または I P F - 1 分解阻害方法により、 I P F - 1 が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の產生促進、例えば G L U T 2 遺伝子の遺伝子産物の產生促進が可能になる。また、 I P F - 1 が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止および／または治療が可能になる。具体的には、例えば G L U T 2 やインシュリンの減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病などの防止および／または治療が可能である。このように本発明は、 I P F - 1 の過剰な分解に起因する疾患の防止および／または治療のために非常に有用である。

【0063】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

CELESTAR LEXICO-SCIENCES, INC.

<120> A system and method of degradation of insulin promoter factor 1, and a method and agent for inhibiting the degradation of the same

<130> NP03-1022

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 283

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asn Gly Glu Glu Gln Tyr Tyr Ala Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Asp

1

5

10

15

Pro Cys Ala Phe Gln Arg Gly Pro Ala Pro Glu Phe Ser Ala Ser Pro

20

25

30

Pro Ala Cys Leu Tyr Met Gly Arg Gln Pro Pro Pro Pro Pro His

35

40

45

Pro Phe Pro Gly Ala Leu Gly Ala Leu Glu Gln Gly Ser Pro Pro Asp

50

55

60

Ile Ser Pro Tyr Glu Val Pro Pro Leu Ala Asp Asp Pro Ala Val Ala

65

70

75

80

His Leu His His Leu Pro Ala Gln Leu Ala Leu Pro His Pro Pro

85

90

95

Ala Gly Pro Phe Pro Glu Gly Ala Glu Pro Gly Val Leu Glu Glu Pro

100

105

110

Asn Arg Val Gln Leu Pro Phe Pro Trp Met Lys Ser Thr Lys Ala His

115

120

125

Ala Trp Lys Gly Gln Trp Ala Gly Gly Ala Tyr Ala Ala Glu Pro Glu

130

135

140

Glu Asn Lys Arg Thr Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Leu Glu
145 150 155 160

Leu Glu Lys Glu Phe Leu Phe Asn Lys Tyr Ile Ser Arg Pro Arg Arg
165 170 175

Val Glu Leu Ala Val Met Leu Asn Leu Thr Glu Arg His Ile Lys Ile
180 185 190

Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Glu Asp Lys Lys
195 200 205

Arg Gly Gly Gly Thr Ala Val Gly Gly Gly Val Ala Glu Pro Glu
210 215 220

Gln Asp Cys Ala Val Thr Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ala Leu Pro Pro
225 230 235 240

Pro Pro Pro Pro Gly Gly Ala Val Pro Pro Ala Ala Pro Val Ala Ala
245 250 255

Arg Glu Gly Arg Leu Pro Pro Gly Leu Ser Ala Ser Pro Gln Pro Ser

260

265

270

Ser Val Ala Pro Arg Arg Pro Gln Glu Pro Arg

275

280

【図面の簡単な説明】

【図1】 m -カルパインまたは μ -カルパインによるIPF-1（配列番号1）の切断認識部位を示す図である。アミノ酸配列は1文字表記し、切断認識部位は下線で示した。

【図2】 ヒト μ -カルパイン、ウサギ m -カルパインおよびラット m -カルパインが、インビトロでヒトIPF-1をカルシウム存在下で分解したことを示す図である。対照は、カルパイン無添加の試料を表わす。図中の+および-はカルシウムの有無を示す。図2Aおよび図2Bはそれぞれ、抗X press抗体および抗IPF-1抗体を用いたウエスタンプロッティングの結果である。矢頭およびアスタリスク（*）はそれぞれ、IPF-1のバンドおよびカルパインによるIPF-1の分解物を示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

【図3】 ヒト m -カルパインがインビトロでヒトIPF-1をカルシウム存在下で分解したことを示す図である。ヒト m -カルパインとカルパインスモールサブユニット1とを共発現させた昆虫細胞のライセートをヒト m -カルパインとして用いた。陰性対照としてカルパイン非発現の昆虫細胞ライセート（図中ではコントロールSf-9細胞ライセートと表示。）およびライセート無添加試料（図中では対照と表示。）を用い、陽性対照としてラット m -カルパインを用いた。図中の+および-はカルシウムの有無を示している。図は抗IPF-1抗体を用いたウエスタンプロッティングの結果である。矢頭およびアスタリスク（*）はそれぞれ、IPF-1のバンドおよびカルパインによるIPF-1の分解物を示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

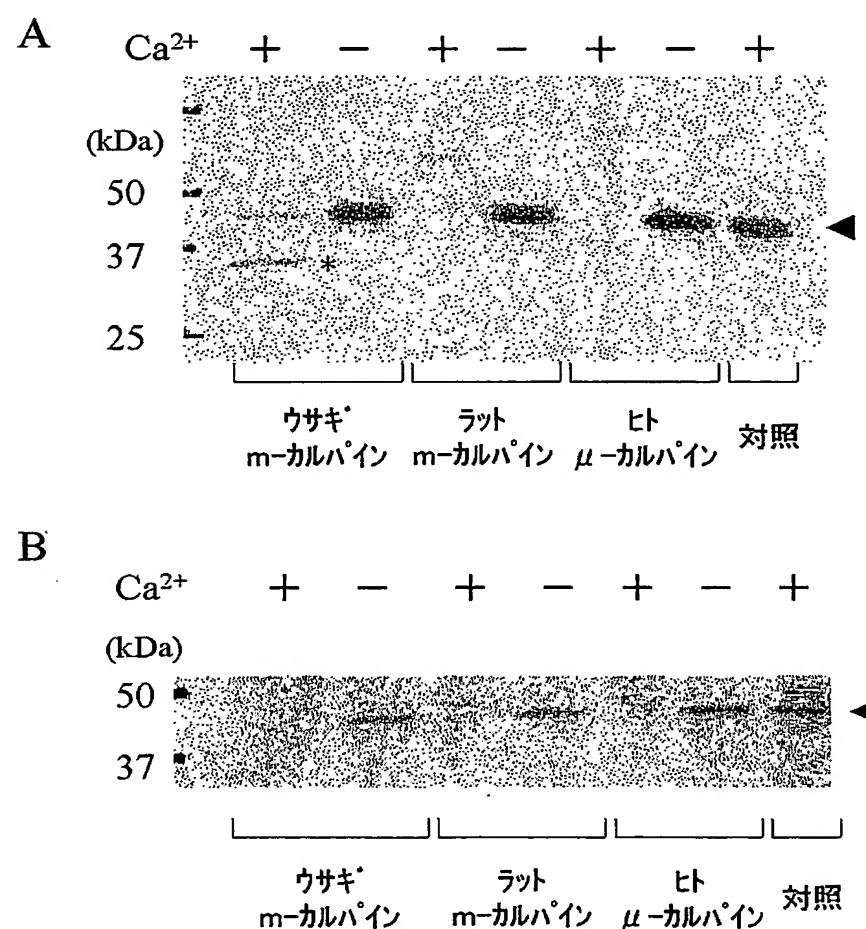
【図4】 イオノフォアの添加により細胞内でIPF-1が分解されたことを示す図である。図は抗IPF-1抗体を用いたウエスタンプロッティングの結果であり、アスタリスク（*）はIPF-1の分解物のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

【書類名】 図面

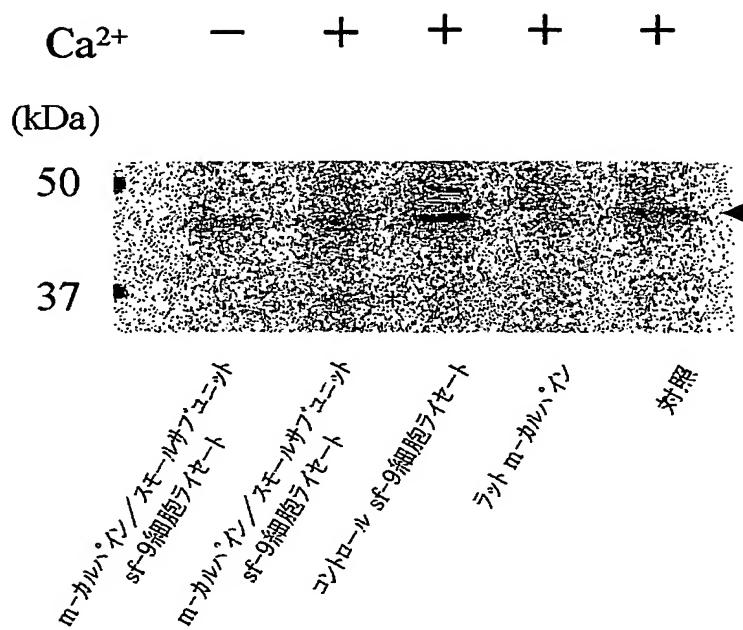
【図1】

1 MNGEEQYYAA TQLYKDPCAF QRGPAPFSA SPPACLYMGR QPPPPPPHPF PGALGALEQG
 61 SPPDISPYEV PPLADDPAVA HLHHHLPAQL ALPHPPAGPF PEGAEPGVLE EPNRVQLPFP
 121 WMKSTKAHAW KGQWAGGAYA AEPEENKRTR TAYTRAQLLE LEKEFLFNKY ISRPRRVELA
 181 VMLNLTERHI KIWFQNRRMK WKKEEDKKRG GGTAVGGGGV AEPEQDCAVT SGEELLALPP
 241 PPPPGGAVPP AAPVAAREGR LPPGLSASPQ PSSVAPRRPQ EPR

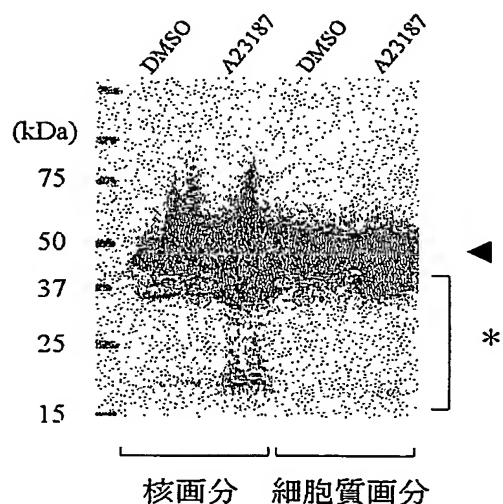
【図2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 インシュリンプロモーターファクター1 (IPF-1) の分解に関与する蛋白質を見出し、IPF-1の分解に起因する疾患の防止手段および／または治療手段を提供すること。

【解決手段】 m —または μ —カルパインがIPF-1を分解することを見出したことに基づいて、IPF-1の分解方法、IPF-1分解剤、IPF-1の分解阻害方法、IPF-1分解阻害剤、IPF-1が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤および産生促進方法、IPF-1分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤並びに防止方法および／または治療方法、カルパインによるIPF-1分解を阻害する化合物の同定方法、該同定方法で得られた化合物、さらにカルパイン、IPF-1、これらをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターを含んでなる試薬キットを提供する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-096372
受付番号	50300534886
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 4月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 3月31日
-------	-------------

次頁無

特願2003-096372

出願人履歴情報

識別番号 [500520628]

1. 変更年月日 2000年10月26日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD

17

氏 名 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

特願 2003-096372

出願人履歴情報

識別番号 [000002831]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋3丁目14番10号
氏 名 第一製薬株式会社